

## USE OF XANTHINE DERIVATIVE FOR MODULATION OF APOPTOSIS

Patent number:	JP10067662	Also published as:	EP0821960 (A1) US5856330 (A1) EP0821960 (B1) AU718237 (B2)
Publication date:	1998-03-10		
Inventor:	MUELLNER STEFAN DR; DAX CLAUDIA DCH		
Applicant:	HOECHST AG		
Classification:			
International	A61K31/52, A61K31/52; A61K31/52; A61K31/52; A61K31/52;		
	A61K31/52, A61K31/52; A61K31/52; A61K31/52;		
	A61K31/52, A61K31/52; A61K31/52; A61K31/52;		
	A61K31/52, A61K31/52; C07D47/304		
European:			
Application number:	JP19970204345 19970730		
Priority number(s):			
<b>Abstract of JP10067662</b> <b>PROBLEM TO BE SOLVED:</b> To enable the production of a medicine for the modulation of apoptosis, capable of suppressing the dephosphorylation of a cofillin and manifesting excellent modulation effects on the apoptosis by using a specific xanthine derivative. <b>SOLUTION:</b> A compound represented by formula I R<2> is a 1-4C alkyl; either one of R<1> and R<3> is represented by the formula (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -R-CH <sub>3</sub> [R is a covalent single bond and (n) is 0-7; R is a group represented by CO and (n) is 1-6; R is a group represented by the formula C(R<4>)(OH), (R<4>) is H or a 1-3C alkyl] and (n) is 1-6] and the other is H, a 1-7C alkyl, a 4-8C cycloalkyl, etc., e.g. 1-(5-hydroxy-5-methylcyclohexyl)-3-methyl-7-propylxanthine is used. Concretely, the medicine is prepared by using, e.g. (A) the compound represented by			

formula I; (B) a compound (salt) represented by formula II ( $R^{<5>}$  is a 1-4C alkyl, etc.;  $R^{<7>}$  is a halogen, etc.; X is N, etc.) or formula III ( $R^{<6>}$  is CF<sub>3</sub>, etc.) and (C) a pharmaceutical excipient.



Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-67662

(43)公開日 平成10年(1998)3月10日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 31/52	ADS		A 61 K 31/52	ADS
	AAA			AAA
	ABA			ABA
	ABD			ABD
	ABE			ABE

審査請求 未請求 請求項の数11 OL (全9頁) 最終頁に統く

(21)出願番号	特願平9-204345	(71)出願人	590000145 ヘキスト・アクチングゼルシャフト ドイツ連邦共和国、65926 フランクフルト・アム・マイン (番地なし)
(22)出願日	平成9年(1997)7月30日	(72)発明者	シユテファン・ミユルナー ドイツ連邦共和国65239ホーホハイム、フリードリヒ-エーベルトーシュトラーゼ43
(31)優先権主張番号	19630837:2	(72)発明者	クラウディア・ダクス ドイツ連邦共和国64579ゲルンスハイム、シャーフシュトラーゼ3ゲー
(32)優先日	1996年7月31日	(74)代理人	弁理士 高木 千嘉 (外2名)
(33)優先権主張国	ドイツ (DE)		
(31)優先権主張番号	19640556:4		
(32)優先日	1996年10月1日		
(33)優先権主張国	ドイツ (DE)		

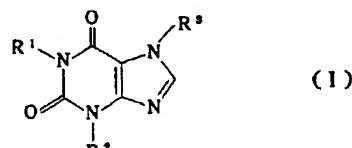
## (54)【発明の名称】アポプトーシスのモジュレーションのためのキサンチン誘導体の使用

## (57)【要約】

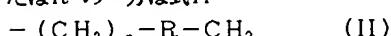
【課題】アポプトーシスのモジュレーションのための医薬としてキサンチン誘導体を提供すること。

【解決手段】アポプトーシスのモジュレーションのための医薬を製造するには式I

## 【化1】



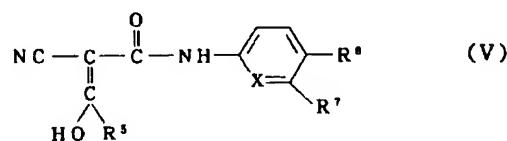
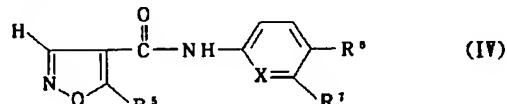
〔式中、R<sup>2</sup>は(C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>) -アルキルであり、基R<sup>1</sup>またはR<sup>3</sup>の一方は式II



〔式中、Rは共有単結合、-CO-または-C(R<sup>4</sup>)(OH)-である〕の基であり、他方の基R<sup>3</sup>またはR<sup>1</sup>はa)水素原子、b)(C<sub>1</sub>～C<sub>7</sub>) -アルキル、c)(C<sub>4</sub>～C<sub>8</sub>) -シクロアルキルアルキルまたはd)炭素鎖が1個の酸素原子により中断されている2～6個の炭

素原子を有するアルキルである〕で表される化合物が適当である。上記式Iの化合物ならびに式IVおよび/またはV

## 【化2】

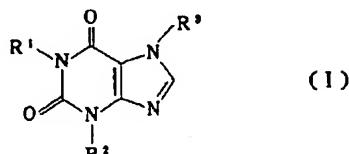


の化合物からなる組み合わせ剤は、アポプトーシスのモジュレーションのための医薬を製造するのに適切である。

## 【特許請求の範囲】

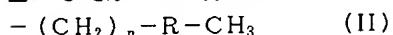
【請求項1】 アボプトーシスのモジュレーションのための医薬を製造するための式I

## 【化1】



## 〔式中、

R²は(C₁～C₄) -アルキルであり、  
基R¹またはR³の一方は式II



## 〔式中、Rは、

- a) 共有単結合であって、nは整数0、1、2、3、4、5、6または7であり、
- b) 基-CO-であって、nは整数1、2、3、4、5または6であり、または
- c) 基-C(R⁴)(OH)-であって、nは整数1、2、3、4、5または6であり、そしてここでR⁴はa)水素原子またはb) (C₁～C₃) -アルキルである}を有する基であり、そして他方の基R³またはR¹は
  - a) 水素原子、
  - b) (C₁～C₇) -アルキル、
  - c) (C₄～C₈) -シクロアルキルアルキルまたは
  - d) 炭素鎖が1個の酸素原子により中断されている2～6個の炭素原子を有するアルキルである]で表される化合物および/または式Iの化合物の場合により立体異性である形態の使用。

## 【請求項2】 式Iにおいて、

R²は(C₁～C₄) -アルキルであり、

基R¹またはR³の一方は、Rが

- a) 基-CO-または
- b) 基-C(R⁴)(OH)-でありそしてnが整数3、4、5または6であり、そしてR⁴が水素原子または(C₁～C₃) -アルキルである式IIを有する基であり、そして他方の基R³またはR¹は(C₁～C₇) -アルキルまたは(C₄～C₈) -シクロアルキルアルキルである化合物を用いる請求項1記載の使用。

## 【請求項3】 式Iにおいて、

R²は(C₁～C₂) -アルキルであり、

R¹は、Rが

- a) 基-CO-または
- b) 基-C(R⁴)(OH)-であり、そしてnが整数3、4、5または6であり、そしてR⁴が水素原子または(C₁～C₂) -アルキルである式IIを有する基であり、そしてR³は(C₁～C₇) -アルキルまたは(C₄～C₈) -シクロアルキルアルキルであるキサンチン誘導体を用いる請求項1または2記載の使用。

## 【請求項4】 式Iにおいて、

R²は(C₁～C₂) -アルキルであり、

R¹は、Rが

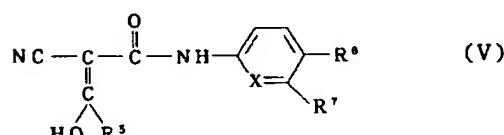
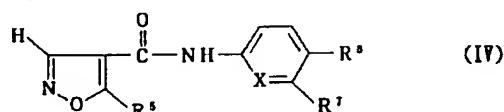
- a) 基-CO-または
- b) 基-C(R⁴)(OH)-であり、そしてnが整数3、4、5または6であり、そしてR⁴が水素原子または(C₁～C₂) -アルキルである式IIを有する基であり、そしてR³は(C₂～C₅) -アルキルまたは(C₄～C₆) -シクロアルキルアルキルであるキサンチン誘導体を用いる請求項1～3のいずれかに記載の使用。

【請求項5】 1-(5-ヒドロキシ-5-メチルヘキシル)-3-メチル-7-プロピルキサンチンを用いる請求項1～4のいずれかに記載の使用。

【請求項6】 1) 請求項1～5に記載の式Iのキサンチン誘導体、

2) 式IVおよび/またはV

## 【化2】



## 〔式中、

- R⁵はa) (C₁～C₄) -アルキル、
- b) (C₃～C₅) -シクロアルキル、
- c) (C₂～C₆) -アルケニルまたは
- d) (C₂～C₆) -アルキニルであり、
- R⁶はa) -CF₃、
- b) -O-CF₃、
- c) -S-CF₃、
- d) -OH、
- e) -NO₂、
- f) ハロゲン、
- g) ベンジル、
- h) フェニル、
- i) -O-フェニル、
- k) -CNまたは
  - l) -O-フェニルであるか、1) (C₁～C₄) -アルキル、2) ハロゲン、3)-O-CF₃または4)-O-CH₃でモノーまたはポリ置換されている-O-フェニルであり、
- R⁷はa) (C₁～C₄) -アルキル、
- b) ハロゲンまたは
- c) 水素原子であり、そして
- Xはa) -CH基または
  - b) 塩素原子である]で表される化合物および/または

式IVまたはVの化合物の場合により立体異性である形態および／または式Vの化合物の生理学的に許容し得る塩および

3) 製薬賦形剤  
からなる組み合わせ製剤。

【請求項7】 式中、

R<sup>5</sup>がa) メチル、  
b) シクロプロピルまたは  
c) (C<sub>3</sub>～C<sub>5</sub>) -アルキニルであり、

R<sup>6</sup>が-CF<sub>3</sub>または-CNであり、

R<sup>7</sup>が水素原子またはメチルでありそしてXは-CH-基である式IVおよび／またはVの化合物を、式IにおいてR<sup>2</sup>が(C<sub>1</sub>～C<sub>2</sub>) -アルキルであり、

R<sup>1</sup>が、Rが

a) 基-CO-または  
b) 基-C(R<sup>4</sup>)(OH)-であり、そしてnが整数3、4、5または6であり、そしてR<sup>4</sup>が水素原子または(C<sub>1</sub>～C<sub>2</sub>) -アルキルである式IIを有する基であり、そしてR<sup>3</sup>が(C<sub>2</sub>～C<sub>5</sub>) -アルキルまたは(C<sub>4</sub>～C<sub>6</sub>) -シクロアルキルアルキルである式Iのキサンチン誘導体と組み合わせて用いる請求項6記載の組み合わせ製剤。

【請求項8】 用いる式Vの化合物がN-(4-トリフルオロメチルフェニル)-2-シアノ-3-ヒドロキシクロトンアミド、2-シアノ-3-シクロプロピル-3-ヒドロキシアクリル酸(4-シアノフェニル)アミドまたはN-(4-トリフルオロメチルフェニル)-2-シアノ-3-ヒドロキシペプター-2-エン-6-インカルボキサミドであり、そして用いるキサンチン誘導体が1-(5-ヒドロキシ-5-メチルヘキシル)-3-メチル-7-プロピルキサンチンである請求項6または7に記載の組み合わせ製剤。

【請求項9】 N-(4-トリフルオロメチルフェニル)-2-シアノ-3-ヒドロキシクロトンアミドおよび1-(5-ヒドロキシ-5-メチルヘキシル)-3-メチル-7-プロピルキサンチンを用いる請求項6～8のいずれかに記載の組み合わせ製剤。

【請求項10】 アポアートーシスのモジュレーションのための医薬の製造のための、請求項1～5のいずれかに記載の式Iの化合物および請求項6～9のいずれかに記載の定義を有する式IVおよび／またはVの化合物の使用。

【請求項11】 移植、自己免疫疾患、梗塞、卒中、炎症、神経変性症、筋腫、筋アトロフィー、筋ジストロフィー、悪液質、全身性炎症反応症候群(SIRS)、成人性呼吸困難症候群(ARDS)、脳マラリア、慢性肺炎、肺サイコイドーシス、再灌流損傷、傷痕形成、腸炎、火傷損傷、後天性免疫不全症候群(AIDS)、癌、タンパク質損失の増加を伴う疾患、慢性腎不全症または肥大性疾患を治療するための請求項10記載の使

用。

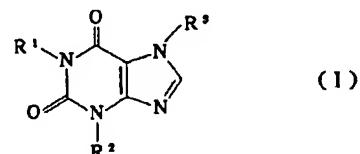
#### 【発明の詳細な説明】

【0001】ネクローシス(壞死)と著しく異なって、アポアートーシスは多細胞生物の生命の必須構成要素である遺伝的に制御された(プログラムされた)細胞死である。生命にとって正常かつ必須であるこのアポアートーシス過程とは著しく異なって多くの形態の病気またはそれらの症状は異常なアポアートーシスの発現、すなわちa)制御されないかまたはb)抑制されたアポアートーシスの発現である〔a〕：梗塞、脳卒中または神経変性症、b)：肥大性疾患〕。したがって、病気の治癒の進行はアポアートーシスの抑制または活性化によって可能である(例えば脊髄の横筋病変、免疫防御等)。規定された死のシグナルが誘起された後に、例えばある種のレセプター(例えばFasレセプター)の刺激により、アポアートーシスは二次的に誘発された互いにかみ合う生化学的事象の複雑なカスケードを介して進行し、その終わりには無傷の細胞が崩壊して膜に包まれた各単位になり、それらは(ネクローシスとは反対に)周囲細胞に損傷を与えずにまたは与えても僅かな損傷だけで生体により廃棄され得るものである。ある場合にはネクローシスとアポアートーシスとの転移は流動的である。すなわちネクローシスがアポアートーシスとなる場合(あるいは逆の場合)がある(例えば梗塞、脳卒中等)。

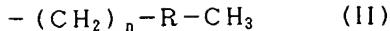
【0002】T細胞中の共刺激因子として、19kDaアクチン結合タンパク質であるコフィリンは免疫反応において非常に重要な役割を果たす。コフィリンは細胞質ゾル中にリン酸化形態で存在し、脱リン酸化後に細胞核中に輸送される。コフィリンは明らかに、核認識配列を全く有しておらず、DNAse I阻害剤として知られているタンパク質アクチンのための輸送分子として役立つものである。この機序により、細胞質ゾルのコフィリンのリン酸化の程度が細胞のアポアートーシスに影響を与える調節およびモジュレーション効果をもたらすことができる。

【0003】本発明によれば、ある種のキサンチン誘導体はコフィリンの脱リン酸化を抑制するのに適しており、したがってそれらはアポアートーシスに対してモジュレーション効果を有するということが見いだされた。すなわち、本発明はアポアートーシスのモジュレーションのための医薬を製造するための式I

#### 【化3】



〔式中、R<sup>2</sup>は(C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>) -アルキルであり、基R<sup>1</sup>またはR<sup>3</sup>の一方は式II



〔式中、Rは

- a) 共有単結合であって、nは整数0、1、2、3、4、5、6または7であり、
- b) 基-CO-であって、nは整数1、2、3、4、5または6であり、または
- c) 基-C(R<sup>4</sup>)(OH)-であって、nは整数1、2、3、4、5または6であり、そしてここでR<sup>4</sup>はa)水素原子またはb)(C<sub>1</sub>～C<sub>3</sub>)アルキルである]を有する基であり、そして他方の基R<sup>3</sup>またはR<sup>1</sup>は
  - a) 水素原子、
  - b) (C<sub>1</sub>～C<sub>7</sub>)アルキル、
  - c) (C<sub>4</sub>～C<sub>8</sub>)シクロアルキルアルキルまたは
  - d) 炭素鎖が1個の酸素原子により中断されている2～6個の炭素原子を有するアルキルである]で表される少なくとも1種のキサンチン誘導体および/または式Iのキサンチン誘導体の場合により立体異性である形態の使用に関する。

【0004】用いるのに好ましい式Iのキサンチン誘導体は式中、R<sup>2</sup>は(C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>)アルキルであり、基R<sup>1</sup>またはR<sup>3</sup>の一方は、Rが

a) 基-CO-または

- b) 基-C(R<sup>4</sup>)(OH)-でありしてnが整数3、4、5または6であり、そしてR<sup>4</sup>が水素原子または(C<sub>1</sub>～C<sub>3</sub>)アルキルである式IIを有する基であり、そして他方の基R<sup>3</sup>またはR<sup>1</sup>は(C<sub>1</sub>～C<sub>7</sub>)アルキルまたは(C<sub>4</sub>～C<sub>8</sub>)シクロアルキルアルキルであるものである。用いるのに特に好ましい式Iのキサンチン誘導体は式中、R<sup>2</sup>は(C<sub>1</sub>～C<sub>2</sub>)アルキルであり、R<sup>1</sup>は、Rが

a) 基-CO-または

- b) 基-C(R<sup>4</sup>)(OH)-であり、そしてnが整数3、4、5または6であり、そしてR<sup>4</sup>が水素原子または(C<sub>1</sub>～C<sub>2</sub>)アルキルである式IIを有する基であり、そしてR<sup>3</sup>は(C<sub>1</sub>～C<sub>7</sub>)アルキルまたは(C<sub>4</sub>～C<sub>8</sub>)シクロアルキルアルキルであるものである。

【0005】用いるのにさらに特に好ましい式Iのキサンチン誘導体は式中、R<sup>2</sup>は(C<sub>1</sub>～C<sub>2</sub>)アルキルであり、R<sup>1</sup>は、Rが

a) 基-CO-または

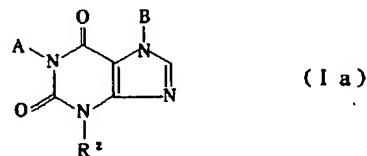
- b) 基-C(R<sup>4</sup>)(OH)-であり、そしてnが整数3、4、5または6であり、そしてR<sup>4</sup>が水素原子または(C<sub>1</sub>～C<sub>2</sub>)アルキルである式IIを有する基であり、そしてR<sup>3</sup>は(C<sub>2</sub>～C<sub>5</sub>)アルキルまたは(C<sub>4</sub>～C<sub>6</sub>)シクロアルキルアルキルであるものである。用いるのに極めて特に好ましい式Iのキサンチン誘導体は1-(5-ヒドロキシ-5-メチルヘキシル)-3-メチル-7-プロピルキサンチンである。

【0006】式Iのアルキル基は直鎖または分枝鎖状である。“(C<sub>4</sub>～C<sub>8</sub>)シクロアルキルアルキル”的表

現は、(C<sub>3</sub>～C<sub>6</sub>)シクロアルキルにより置換されているアルキル基を意味し、全炭素原子の合計は8であるかまたはそれより少ない。これらの例としてはシクロプロピルメチル～ベンチル基、シクロブチルメチル～ブチル基、シクロベンチルメチル～プロピル基並びにシクロヘキシルメチルおよびエチル基がある。基“(O)”は酸素原子である。“アポブトーシスのミュレーション”はアポブトーシスの阻害または誘発を意味するものと解される。

【0007】式Iのキサンチン誘導体は知られた方法で製造される(US 3,737,433; US 4,108,995; US 4,833,146参照)。例えば1つの方法は式Ia

【化4】



〔式中、R<sup>2</sup>は炭素原子1～4個を有するアルキル基であり、Aは水素原子、(C<sub>4</sub>～C<sub>8</sub>)シクロアルキルアルキル、(C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>)アルコキシアルキルまたは式IIの基でありしてBは水素原子、(C<sub>4</sub>～C<sub>8</sub>)シクロアルキルアルキル、(C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>)アルコキシアルキル、式IIの基、またはベンジルもしくはジフェニル基であるが、しかしこれらの基AおよびBのうちの少なくとも1つは水素原子である]を有する3-アルキルキサンチンを直接、または塩基性縮合剤の存在下、またはその塩の1種の形態で、1-および/または7-位において式III

X-Q (III)

〔式中、Xはハロゲン原子、スルホン酸エステル基またはリン酸エステル基でありしてQは(C<sub>4</sub>～C<sub>8</sub>)シクロアルキルアルキル、(C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>)アルコキシアルキルまたは式IIの基である]を有する適当なアルキル化剤で1段階または段階的にアルキル化し、引き続き0℃と各場合に使用する反応媒体の沸点との間の反応温度で、基Bがベンジルまたはジフェニルメチル基の場合にはそれを還元的に除去し、または場合により基Bの位置からアルコキシメチル基を加水分解で除去し、そして/またはAまたはBがオキソアルキル基の場合にはそのケト基をアルコール官能に還元することからなる。各反応の出発物質は知られているか、または文献で知られた方法で容易に製造することができる。

【0008】本発明はまた、少なくとも1つの有効量の式Iのキサンチン誘導体を製薬上適当であってかつ生理学的に許容し得る賦形剤、希釈剤および/または他の活性化合物および補助剤とともに含有する、アポブトーシスのミュレーションのための医薬に関する。本発明はまた、少なくとも1種の式Iのキサンチン誘導体を生理

学的に許容し得る賦形剤およびさらにまた適当な活性化合物、添加剤または補助剤で適当な投与形態にすることからなる、アポブトーシスのミュレーションのための医薬の製造方法に関する。

【0009】本発明による医薬は非経口的に、経口的にまたは直腸に投与されるか、あるいは適切ならば局所的に適用される。固体または液体製剤の適当な形態としては例えば顆粒、粉末、コーティング錠剤、錠剤、(マイクロ)カプセル、坐薬、シロップ、ジュース、懸濁剤、乳剤または注射液およびまた活性化合物の持続徐放性製剤がある。その製剤中では慣用の補助剤例えば賦形剤、崩壊剤、結合剤、コーティング剤、潤滑剤、滑沢剤または潤滑剤、香味剤、甘味剤または溶解剤が使用される。頻繁に使用する補助剤としては例えば炭酸マグネシウム、二酸化チタン、ラクトース、マンニトールおよび他の糖、タルク、ラクトプロテイン、ゼラチン、デンプン、セルロースおよびその誘導体、動物性ないし植物性油、ポリエチレンジコール類および溶剤例えば滅菌水および一価アルコールもしくは多価アルコール例えばグリセロールを挙げることができる。

【0010】式Iのキサンチン誘導体の薬理学的性質のために、これらの化合物は特定のアポブトーシスのミュレーションに使用することができる。すなわち、制御されていないアポブトーシスに関する疾患例例えば梗塞、筋腫、筋アトロフィー、筋ジストロフィー、悪液質、全身性炎症反応症候群(SIRS)、成人性呼吸困難症候群(ARDS)、脳マラリア、慢性肺炎、肺サイコイドーシス、再灌流損傷、傷痕形成、腸炎、後天性免疫不全症候群(AIDS)、癌、タンパク質損失の増加を伴う疾患、脳卒中、神經変性症、慢性腎不全症、火傷損傷または肥大性疾患を治療することができる。

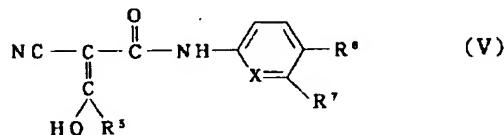
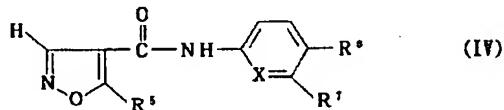
【0011】製剤は、各単位が活性成分として少なくとも1種の式Iのキサンチン誘導体の一定量を含有する投与量単位で調製しかつ投与するのが好ましい。固体投与量単位例えば錠剤、カプセル、コーティング錠剤または坐薬の場合には、その投与量は約1000mg未満、好ましくは100~600mgである。アンプル剤中の注射液の場合には300mg未満、好ましくは20~200mgである。成人患者(70kg)の治療の場合には、初期段階で1日当たり100~2000mgの静脈内注入処置が必要である。後のリハビリテーション段階では1日当たり400mgの、特に1-(5-ヒドロキシ-5-メチルヘキシル)-3-メチル-7-プロピルキサンチンの経口投与3回が必要である。しかし、ある状況下ではより多くのまたはより少ない投与量でも適当である。投与量の投与は、個々の投与量単位または幾つかの少投与量単位の形態での单一投与によるか、または特定の間隔での細分化投与量の反復投与により実施することができる。最後に、前記各製剤形態の製造における式Iのキサンチン誘導体および/または、適切な場合に

はそれらの対応する塩もまた、他の適当な活性化合物例えは遊離酸素ラジカルを捕獲する活性化合物、例えば1,ラージヒドロ-4H-ピラゾロ(3,4-d)ピリミジン-4-オン、スーパーオキシダムターゼ、ジメチルスルホキシドまたはマンニトール、ヘパリン、アスコルビン酸またはデフェロキサミンと一緒に処方することができる。さらに、式Iのキサンチン誘導体および式IVまたはVの化合物からなる組み合わせ製剤はコフィリンの脱リン酸化にスーパーアディティブ(相乗的、super additive)抑制作用を示し、アポブトーシスの調節に向かう。この作用の大きさのためにこの組み合わせ製剤の使用は、今まで個別成分により閉ざされていた領域、例えば免疫抑制療法にまで及ぶことができる。すなわち、本発明は

1) 前記の定義を有する少なくとも1種の式Iのキサンチン誘導体、

2) 式IVおよび/またはV

#### 【化5】



〔式中、R<sup>5</sup>はa) (C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>) -アルキル、

b) (C<sub>3</sub>~C<sub>5</sub>) -シクロアルキル、

c) (C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>) -アルケニルまたは

d) (C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>) -アルキニルであり、

R<sup>6</sup>はa) -CF<sub>3</sub>、

b) -O-CF<sub>3</sub>、

c) -S-CF<sub>3</sub>、

d) -OH、

e) -NO<sub>2</sub>、

f) ハロゲン、

g) ベンジル、

h) フェニル、

i) -O-フェニル、

k) -CNまたは

1) -O-フェニルであるか、1)(C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>) -アルキル、2)ハロゲン、3)-O-CF<sub>3</sub>または4)-O-CH<sub>3</sub>でモノ-またはポリ置換されている-O-フェニルであり、

R<sup>7</sup>はa) (C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>) -アルキル、

b) ハロゲンまたは

c) 水素原子であり、そして

Xはa) -CH基または

b) 窒素原子である]で表される化合物および/または

式IVまたはVの化合物の場合により立体異性である形態および／または式Vの化合物の生理学的に許容し得る塩および

### 3) 製薬賦形剤

からなるアポブトーシスのモジュレーションのため組み合わせ製剤に関する。

【0012】使用に好ましいのは式中、R<sup>5</sup>はa) メチル、

b) シクロプロピルまたは

c) (C<sub>3</sub>～C<sub>5</sub>) -アルキニルであり、R<sup>6</sup>は-CF<sub>3</sub>または-CNであり、R<sup>7</sup>は水素原子またはメチルでありそしてXは-CH-基である式IVおよび／またはVの化合物を、式IにおいてR<sup>2</sup>は(C<sub>1</sub>～C<sub>2</sub>) -アルキルであり、R<sup>1</sup>は、Rが

a) 基-CO-または

b) 基-C(R<sup>4</sup>)(OH)-であり、そしてnが整数3、4、5または6であり、そしてR<sup>4</sup>が水素原子または(C<sub>1</sub>～C<sub>2</sub>) -アルキルである式IIを有する基であり、そしてR<sup>3</sup>は(C<sub>2</sub>～C<sub>5</sub>) -アルキルまたは(C<sub>4</sub>～C<sub>6</sub>) -シクロアルキルアルキルであるIVおよび／またはVの化合物および／または場合により式IVまたはVの化合物の場合により立体異性形態および／または式Vの化合物の塩である。

【0013】使用するのに特に好ましいのは、1-(5-ヒドロキシ-5-メチルヘキシル)-3-メチル-7-プロピルキサンチンと組み合わせるN-(4-トリフルオロメチルフェニル)-2-シアノ-3-ヒドロキシクロトンアミド、2-シアノ-3-シクロプロピル-3-ヒドロキシアクリル酸(4-シアノフェニル)アミドまたはN-(4-トリフルオロメチルフェニル)-2-シアノ-3-ヒドロキシヘプター-2-エン-6-インカルボキサミドである。式IVまたはVの化合物の製造は、例えばEP 484,223; EP 529,500; US 4,061,767; EP 538,783またはEP 551,230に記載のような知られた方法で実施される。各化学反応のための出発物質は知られているか、または文献に知られた方法で容易に製造することができる。

【0014】アルキル、アルケニルまたはアルキニルの用語は、その炭素鎖が直鎖または分枝鎖状であることが可能な基を意味するものと解される。さらに、そのアルケニルまたはアルキニル基はまた1個以上の二重結合または1個以上の三重結合を含有することができる。環状アルキル基は例えば、3-～5-員の单環例えばシクロプロピル、シクロブチルまたはシクロペンチルである。

“スーパーアディティブ”的用語は個々の作用の合計よりも大きい作用を意味するものとして解される。

【0015】本発明による組み合わせ製剤は、例えば移植、自己免疫疾患、梗塞、脳卒中、炎症、神経変性症、筋腫、筋アトロフィー、筋ジストロフィー、悪液質、全身性炎症反応症候群(SIRS)、成人の呼吸困難症候

群(ARDS)、脳マラリア、慢性肺炎、肺サイコイドーシス、再灌流損傷、傷痕形成、腸炎、火傷損傷。後天性免疫不全症候群(AIDS)、癌、タンパク質損失の増加を伴う疾患、慢性腎不全症または肥大性疾患の治療に適している。本発明による組み合わせ製剤はまた、各成分を互いに次々に入れてある組成物または組み合わせパックを包含することもでき、そしてそれ故に各ヒトまたは動物の身体中に同時に個別にまたは各時間間隔をおいて使用することができる。本発明はまた、アポブトーシスのモジュレーションのため組み合わせ製剤の製造方法にも関する。それは少なくとも1種の式Iのキサンチン誘導体および式IVまたはVの化合物を生理学的に許容し得る賦形剤およびまた適当な活性化合物、添加剤または補助剤を用いて適当な投与形態にすることからなる。

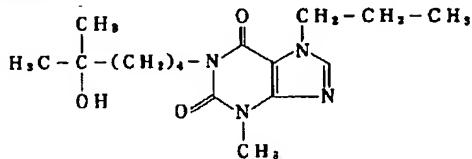
【0016】本発明による組み合わせ製剤は例えばカプセル(マイクロカプセルを包含し、一般には製薬賦形剤を含有しない)、錠剤例えばコーティング錠剤、および丸剤または坐薬のような製剤形態での投与量単位ができる。カプセルを使用する場合には、カプセル物質は賦形剤の機能を果たしそして内容物は例えば粉末、ゲル、溶液、乳液または分散液として存在することができる。しかし、計算された量の活性化合物を含有する2種の活性化合物成分1)および2)をいずれか所望の製薬賦形剤と一緒に含有する経口または非経口製剤を製造するのが特に有利かつ簡単である。また、直腸療法用の適当な製剤(坐薬)も使用することができる。同様に、本発明による組み合わせを含有する軟膏またはクリーム形態の経皮投与、非経口(静脈内、皮下、筋肉内)注射または溶液の経口投与が可能である。活性化合物の外に、軟膏、ペースト、クリームおよび粉剤は慣用賦形剤例えば動物性および植物性脂肪、シリコン、珪酸、水酸化アルミニウム、タルク、酸化亜鉛、ラクトース、ベントナイト、珪酸カルシウムおよびポリアミド粉末またはこれら物質の混合物を含有することができる。錠剤、丸剤または顆粒は例えば圧縮法、浸漬法ないし流動床法またはパンコーティングのような方法により製造されそして賦形剤および他の慣用補助剤例えばゼラチン、アガロース、デンプン(例えば馬鈴薯、トウモロコシまたはコムギのデンプン)、セルロース例えばエチルセルロース、シリカ、炭酸マグネシウム、種々の糖例えばラクトースおよび／またはリン酸カルシウムを含有することができる。コーティング溶液は通常、糖および／またはデンプンのシロップからなり、通常はまたゼラチン、合成セルロースエステル、アラビアゴム、ポリビニルピロリドン、顔料、界面活性物質、可塑剤および従来法に相当する同様の添加剤をも含有する。製剤の製造にはいずれか慣用の流動調整剤、潤滑剤または滑潤剤例えばステアリン酸マグネシウム、および分離剤を使用することができる。これらの製剤はコート／コア錠剤または多層錠剤の形態を有し、活性成分2はコートもしくはコア中にま

たは1つの層中に存在し、一方活性成分1はコア、コートまたは別の層中に存在するのが好ましい。また活性化合物成分は持続徐放形態で存在するか、またはデボ材上へ吸着されるかまたはデボ材〔例えばセルロースまたはポリスチレン樹脂基材(例えばヒドロキシエチルセルロース)〕中に包含されることもできる。また活性化合物の遅延された放出は、慣用の腸溶コーティングに関与する層または仕切りを付与することにより遂行することができる。使用する投与量は勿論、種々の因子例えば治療する生物(すなわちヒトまたは動物)、年齢、体重、一般的な健康状態、症状の重度、治療すべき疾患、同時に生ずる可能性のある疾患(存在する場合には)、他の医薬による同時治療の性質または治療頻度に左右される。投与量は一般に、1日当たり数回、好ましくは1~3回投与する。使用する個別の活性化合物の量はこの場合、各個別の活性化合物の1日当たりの推奨投与量をベースとするが、一般に組み合わせ製剤では1日当たりの推奨投与量の10%~100%、好ましくは20%~80%、特に好ましくは50%であるべきである。すなわち、本発明による組み合わせでの適当な療法は例えば、2mg~250mg、好ましくは5mg~150mg、より好ましくは10mg~50mg、最も好ましくは10mg~20mgのN-(4-トリフルオロメチルフェニル)-2-シアノ-3-ヒドロキシクロトンアミドナトリウム塩および100mg~600mg、好ましくは150mg~300mg、より好ましくは20mg~200mgの1-(5-ヒドロキシ-5-メチルヘキシル)-3-メチル-7-プロピルキサンチンからなる製剤を1、2または3回の個別投与量で投与することである。

## 【0017】実施例1

1-(5-ヒドロキシ-5-メチルヘキシル)-3-メチル-7-プロピルキサンチンの製造

## 【化6】



無水エーテル21中に懸濁した3-メチル-1-(5-オキソヘキシル)-7-プロピルキサンチン61.3g(0.2モル)の懸濁液に、テトラヒドロフラン中の20%溶液形態の塩化メチルマグネシウム22.4g(0.3モル)を激しく攪拌しながら室温で滴加し、内部温度は約30°Cに上昇される。次いで混合物を攪拌しながら還流下で2時間加温し、飽和塩化アンモニウム水溶液で処理して生成したアルコキシドを分解し、有機相を完全に分離し、それぞれ500mlずつの水で2回洗浄する。水性相を集め、それをジクロロメタンで再び抽出する。このジクロロメタン抽出物をエーテル相と合一し、

硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し次いで減圧下で蒸発させて粗生成物59.0g(理論量の91.5%)を得、それをジイソプロピルエーテルからの再結晶により精製する。

収量: 49.8g(理論量の77.2%)；融点: 81~82°C。

元素分析値[C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>(分子量=322.4)として]:

計算値: C 59.61% H 8.13% N 17.38%

実測値: C 59.72% H 8.09% N 17.44%

## 【0018】実施例2

## 薬理試験

## 2.1 細胞培養

マウスのマクロファージ細胞系RAW264.7をATCC(Rockville, MD)から得、D MEM(Sigma社製、St.Louis, MO)中で4.5gグルコース/1、110mgピルビン酸ナトリウム/1、10%熱不活化FCS(Gibco社製、GrandIsland, NY)およびペニシリントラベプトマイシン(50U/50mg/ml)とともに培養した。マクロファージを2~3日毎に継代を行い、実験開始の1日前に組織培養フラスコ(75cm<sup>2</sup>, Falcon, Becton Dickinson社製、Heidelberg, Germany)に2.10<sup>6</sup>個の細胞を入れた。これらの細胞に新培地を供給し、各製剤を適当な濃度で加えた。1-(5-ヒドロキシ-5-メチルヘキシル)-3-メチル-7-プロピルキサンチン(化合物1)を20mMで細胞培地中に溶解した。このうち、100μl(100μM)および50μl(50μM)をピペットで培地20ml中に入れた。N-(4-トリフルオロメチルフェニル)-2-シアノ-3-ヒドロキシクロトンアミドナトリウム塩(化合物2)を12mMで細胞培地中に溶解した。このうち、それぞれ100μl(最終濃度60μM)、33μl(最終濃度20μM)、および16.7μl(最終濃度10μM)をピペットで培地20ml中に入れた。製剤との前培養の1時間後に10ng/ml濃度のリボポリサッカリド(LPS; 大腸菌、セロタイプ0127: B8 Sigma社製、St.Louis, MO)で刺激した。リボポリサッカリドの原液(10%ジメチルスルホキシド(DMSO)中のLPS 1mg/ml)を培地で希釈して1μg/mlの濃度にし、-20°Cで保存した。これらの細胞を10%CO<sub>2</sub>中で37°Cにおいて24時間(h)培養した。

## 【0019】2.2 試料調製

使用する全ての薬品は分析上純粋であるかまたは電気泳動に適用される品質であって、他の供給源が別個に示されていない場合にはMillipore社(Bedford, MA)またはSigma社(St.Louis, MO)から得た。2-D電気泳動(2-DE)はインベスティゲータ・システム(Investigator System<sup>(R)</sup>: Millipore社製)を使用して実施し、そして若干

変更させたが製造者の手法により試料を処理した。付着性のマウスマクロファージを氷上に置きながら60秒毎に、10mlの氷冷PBSで3回洗浄した。次いで細胞を100ml中において0.3gのSDS、3.088gのDTT、0.444gのトリスHClおよび0.266gのトリス塩基からなる沸騰溶菌バッファー1ml中で溶菌した。細胞溶菌物を完全に解体し、2ml試料容器中において沸騰水中で10分(min)加熱した。ベンゾナーゼ(Benzonase<sup>(R)</sup>; Merck社製, Darmstadt, Germany)の添加によりポリヌクレオチドを37°Cにおいて30分で分解した。試料調製のこの時点で適量を採り、そのタンパク質含有量をPopov氏の方法により測定した。前記2-DEのために、試料タンパク質を氷冷アセトン(80% v/v)に滴加することにより沈殿させた。試料を20分間氷上で冷却し、次いで240gで10分間遠心分離した。乾燥したペレットを溶菌バッファー1部および試料バッファー4部中に取り入れて5mg/mlのタンパク質含有量を得た。この試料バッファーは100ml中において59.7gの尿素、4.0mlのNP-40、1.54gのDTT、5.5mlの担体両性電解質(pH 3~10, 2-DEに最適化された)からなる。未溶解物質は電気泳動の前に、試料を16000×gで遠心分離することにより完全に分離した。

#### 【0020】2.3 2-DE ゲル電気泳動

高分解能二次元ゲル電気泳動を、例えばGarrels氏が記載のような変形を伴ったO'Farrell氏の手法により実施した。これを行うためにはMillipore Investigator<sup>(R)</sup> 2-D電気泳動系(Millipore社製, Bedford, MA)を用いた。ロッドの膨張および破壊を防止する厚さ0.08mmの繊維を使用して、ガラス毛細管(直径1mm)中で等電点電気泳動(Isoelectric focussing)を実施した。

IEFゲルは4.1%T, 2.4%Cポリアクリルアミドマトリックスからなり、それは30.8%T, 2.6%C原液、9.5M尿素、2.0% (v/v) NP-40、10mMのCHAPSおよび2% (v/v) 担体両性電解質(pH 3~10, 2-DEに最適化された)からなる。陽極バッファーとして0.001MのH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>を、そして陰極バッファーとして0.1MのNaOHを使用した。pH勾配形成のためのプレフォーカシング(prefocussing)の前に、0.5M尿素、0.2% (v/v) NP-40、0.1% (v/v) 担体両性電解質および50mMのDTTからなる試料コーティングバッファー15μlを適用した。最大電流110μA/ゲルで90分以内に500ボルトの最大電圧に達した。プレフォーカシング後に試料(タンパク質100μg)の20μlおよびさらにコーティングバッファー15μlを適用した。タンパク質の等

電点電気泳動は18000Vh以内で実施した。電気泳動の終了後に、ロッドを氷上で冷却し、0.3Mトリス塩基、0.075MトリスHCl、6% SDS、50mMのDTTおよび0.01%プロモフェノールブルー(Bromophenol Blue)からなるバッファー中で平衡化した。ロッドゲルを第2次元のパーティカルゲルの表面に直接移し、使用するまで-20°Cに保存した。第2次元はゲルを収集せずにSDS勾配ゲル(10~17%)中で実施した。この勾配は下記の2種のゲル溶液を混合することにより調製した。

【0021】A: 100mlのアクリルアニド(30.5%T, 1.64%C)、73mlのトリス(1.5M, pH8.8)、123mlのH<sub>2</sub>O、3mlのSDS(10%)、150μlのTEMEDおよび750μlのアンモニウムペルオキソジスルフェート(10%)。

B: 170mlのアクリルアミド、73mlのトリス、66.78gのグリセロール、3mlのSDS、150μlのTEMED、750μlのアンモニウムペルオキソジスルフェート。

電気泳動は一定の温度で、25mMのトリス塩基、192mMのグリシンおよび0.1% SDSからなる流出バッファー中で、プロモフェノールブルーが約1cmゲルの端から除去されるまで一夜実施した。電気泳動の終了後、ゲル中の各タンパク質をHeukeshoven and Dernickにより銀試薬で染色した。2-DEゲルの分析および合成像の調製はBioImage System(BioImage Systems社製)を使用して実施した。得られたタンパク質パターンをコダックメガプラス(Kodak megaplus)カメラのモデル1.4により走査し、データをHAMステーションにより処理した。

#### 【0022】2.4 結果

刺激されていない対照の結果は100%に等しくセットした。LPS(10ng/ml)の添加はコフィリンの50%脱リン酸化をもたらした。LPS(10ng/ml)および化合物1(100μM)の同時適用はコフィリンの10%脱リン酸化をもたらした。すなわち、脱リン酸化の抑制はLPSで処理しただけのマクロファージと比較して80%である。結果は表1に示されているとおりである。最終濃度100μlと比較して、化合物1の最終濃度50μlは不活性である。化合物2も同様に最終濃度20μlまでは作用がなく、それは60μlにおいてのみ活性である。化合物1および化合物2を、それぞれ個々の化合物が不活性である濃度範囲において合一する場合には、驚くべきことにスーパー・アディティブ(相乗的)作用が生ずる。

#### 【0023】

【表1】

<u>RAW 264.7 マウスマクロファージ</u>	<u>コフィリンスポットの強度(%)</u>	<u>強度の減少抑制(%)</u>
対照	100	0
LPS (10ng/ $\mu$ l)	50	0
LPS+化合物1(50 $\mu$ M)	50	0
LPS+化合物1(100 $\mu$ M)	55	10
LPS+化合物2(10 $\mu$ M)	50	0
LPS+化合物2(20 $\mu$ M)	50	0
LPS+化合物1(50 $\mu$ M)+ 化合物2(10 $\mu$ M)	60	20
LPS+化合物1(50 $\mu$ M)+ 化合物2(20 $\mu$ M)	90	80

フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>6</sup> A 61 K 31/52	識別記号 ABJ ABN ACD ACJ ACV ADU ADY AED AGZ	府内整理番号 F I A 61 K 31/52	技術表示箇所 ABJ ABN ACD ACJ ACV ADU ADY AED AGZ
C 07 D 473/04 // C 07 M 7:00		C 07 D 473/04	